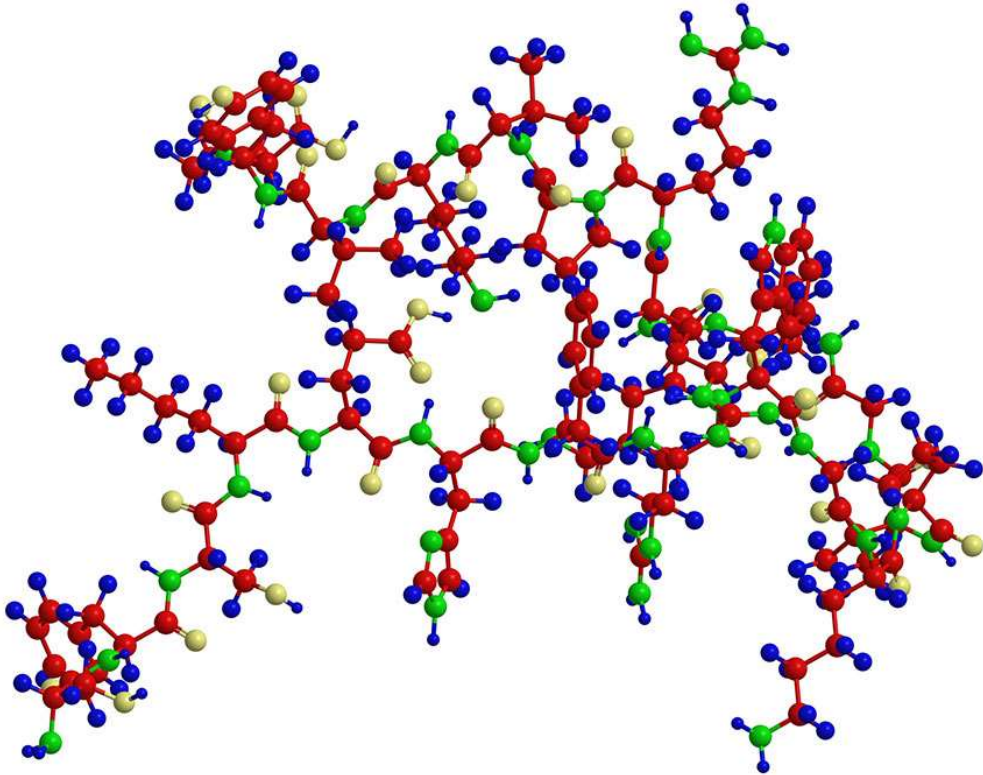




Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

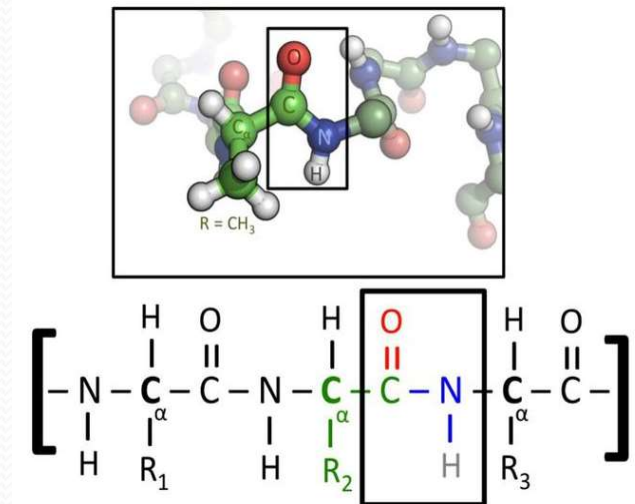
ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Σταθερότητα πεπτιδίων & πρωτεϊνών



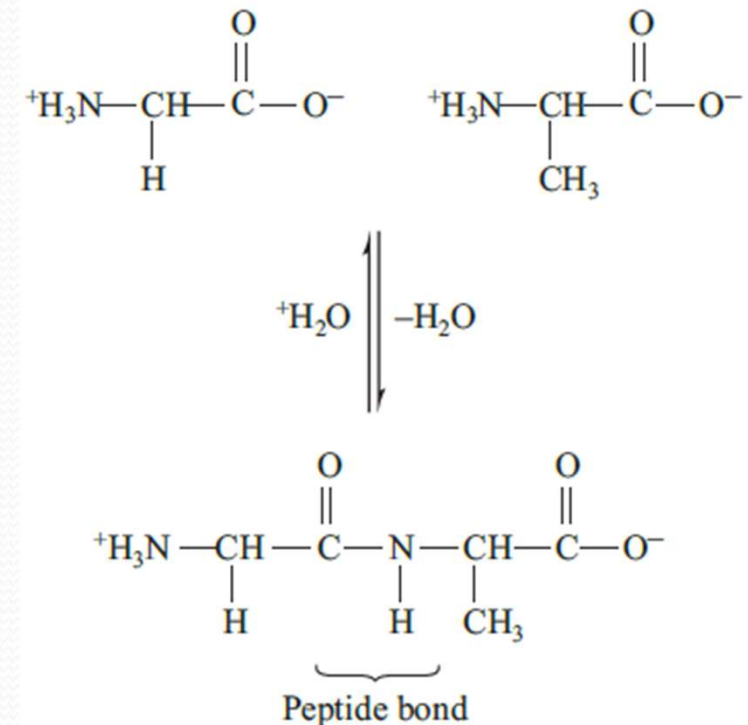
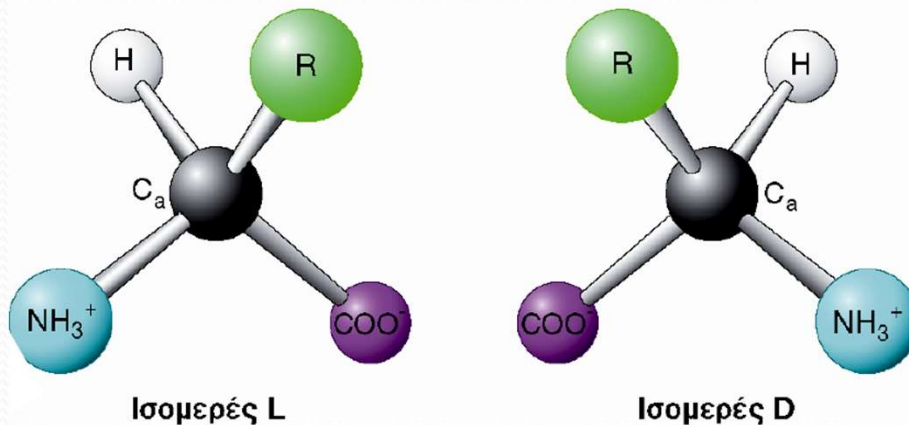
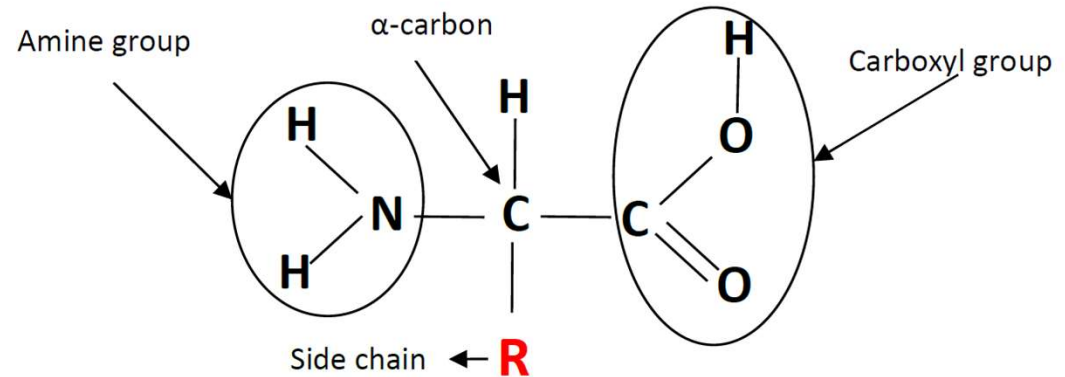
Τι είναι πρωτεΐνη;

- Οι πρωτεΐνες αποτελούν τα πιο διαδεδομένα και πολυδιάστατα, τόσο στη μορφή όσο και στη λειτουργία τους, μακρομόρια.
- Μεγάλα σύνθετα βιομόρια με μοριακό βάρος συνήθως >10.000 Da
- Δομική μονάδα: αμινοξέα
- Ο «όρος» protéine προτάθηκε το 1838 από τον Jöns Jakob Berzelius (Σουηδός χημικός, 1779-1848) από την ελληνική λέξη <<πρώτος>>



Τι είναι πρωτεΐνη: αμινοξέα

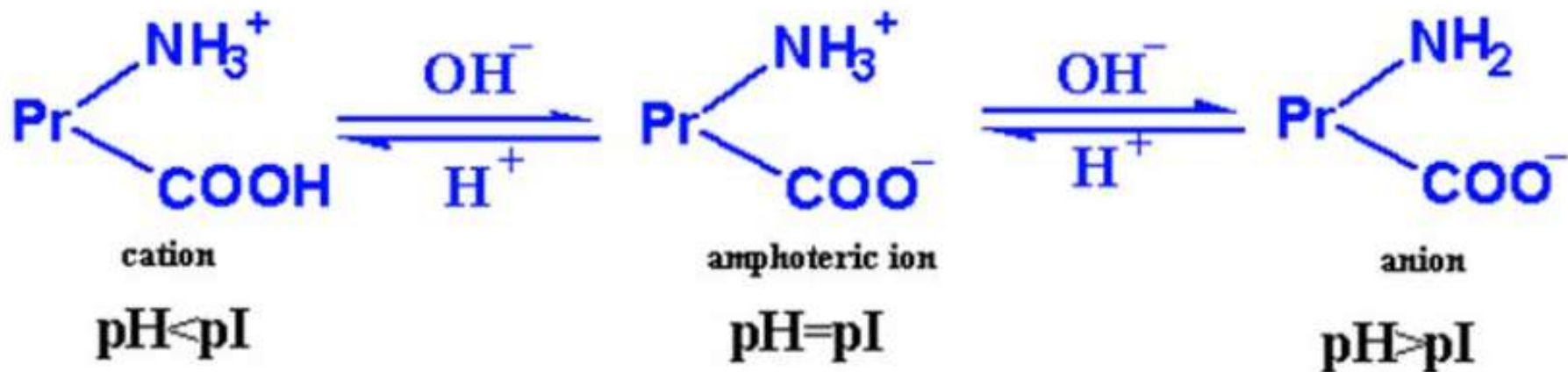
- Τα 20 αμινοξέα, μέσο MB 135
- Όλα έχουν ένα οξύ και μία βάση
- Κεντρικός α-carbon χειρόμορφος
- Μόνο L-αμινοξέα στις πρωτεΐνες
- Εκτός γλυσίνης, R=H



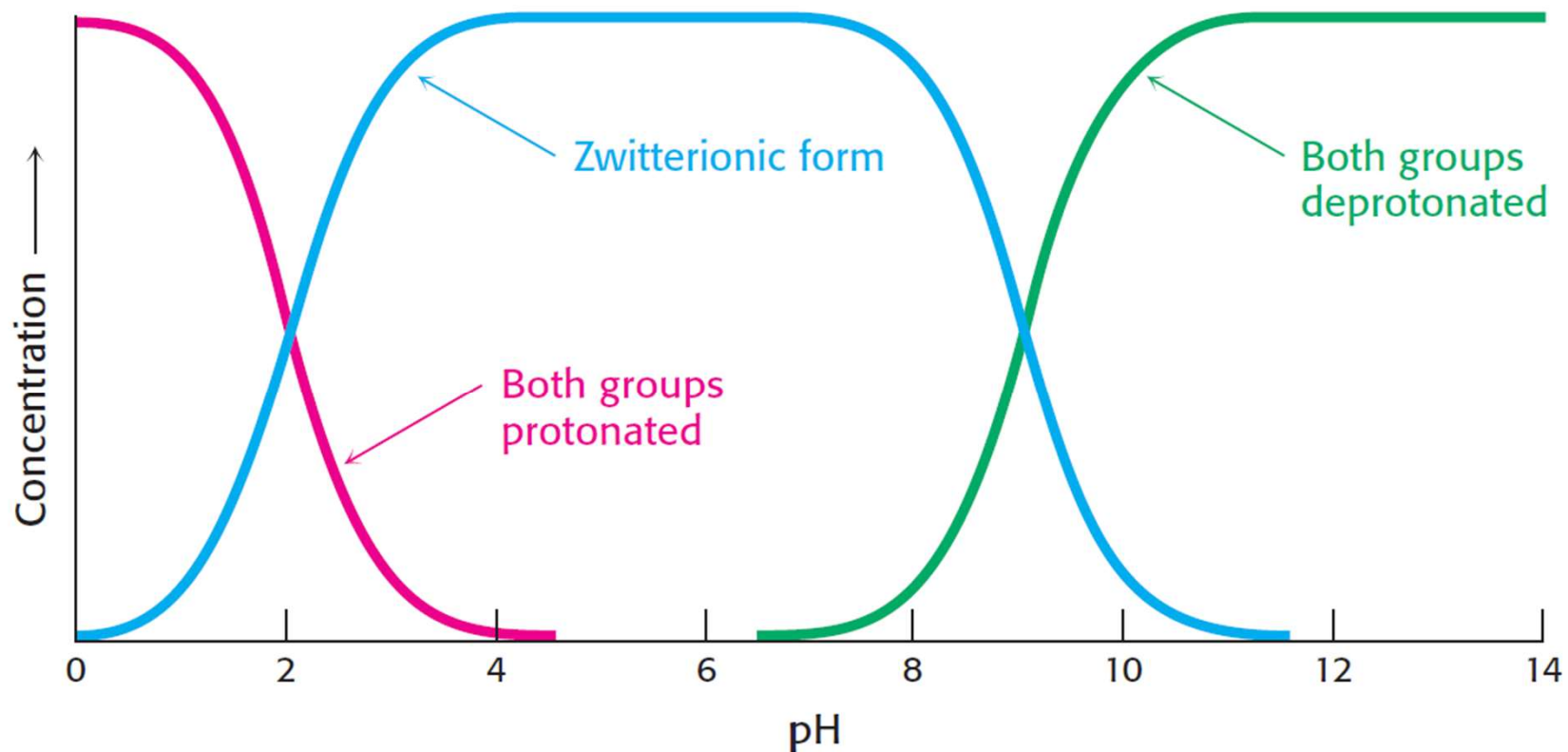
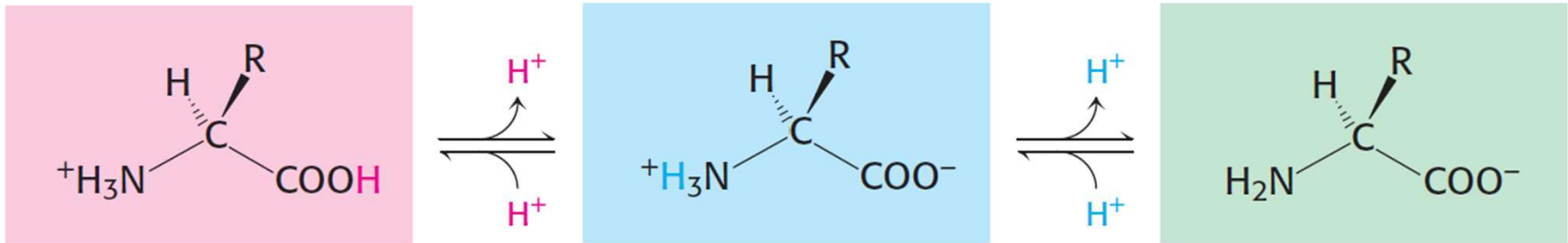
- Το pH επηρεάζει πιο μέρος του μορίου είναι πρωτονιομένο
- Ο δεσμός 2 αμινοξέων λέγεται πεπτιδικός
- Δίπολα ιόντα: (NH₃⁺) και (COO⁻)

Φυσικά χαρακτηριστικά

- Η παρουσία οξέος και βάσης στο ίδιο μόριο: μεταφορά πρωτονίου από το οξύ στη βάση
- Τα αμινοξέα με ταυτόχρονα θετική και αρνητική περιοχή στο μόριο λέγονται zwitterion: το συνολικό φορτίο είναι μηδέν.
- Τα αμινοξέα λόγω των φορτίων είναι υδατοδιαλυτά.
- Το pH στο οποίο η πρωτεΐνη έχει μηδενικό καθαρό φορτίο αναφέρεται ως ισοηλεκτρικό σημείο (pI).
- Ιδιότητες αμφολύτη: περιέχει οξύ και βάση στο ίδιο μόριο.



Αμφολύτες αμινοξέα



- Ο ιονισμός των αμινοξέων αλλάζει με το pH.
- Το zwitterion επικρατεί στο φυσιολογικό pH, περίπου 7,4

Ο γενετικός κώδικας

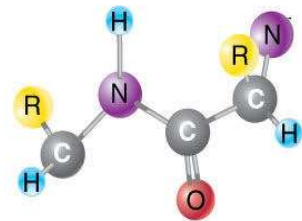
- Το DNA (deoxyribonucleic acid) έχει 2 σκοπούς:
- α) να δημιουργήσει καινούργιο αντίγραφο (replication) DNA και
- β) να δημιουργήσει RNA (ribonucleic acid) με μεταγραφή (transcription), το οποίο περιλαμβάνει τη μετάφραση (translation): τη σύνθεση πρωτεϊνών.
- Αυτές οι πρωτεΐνες είναι βασικές για τη διατήρηση της ζωής.
- Συστατικά DNA και RNA: αδενίνη (A), γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C) είναι κοινές βάσεις.
- Θυμίνη (T) βρίσκεται μόνο στο DNA, ενώ η ουρακίλη (U) μόνο στο RNA.
- DNA, RNA: νουκλεϊκά οξέα επειδή βρίσκονται στον πύρινα των κυττάρων
- DNA: είναι συστατικό των χρωμοσωμάτων, τα οποία περιέχουν τα γονίδια, τα οποία μεταφέρουν την πληροφορία-γενετικό κώδικα, για την δημιουργία των πρωτεϊνών

Table 1.1 The Genetic Code

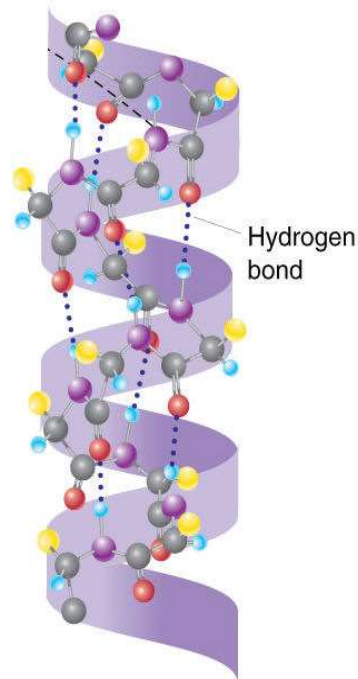
1st base	2nd base				3rd base
	T	C	A	G	
T	Phe	Ser	Tyr	Cys	T
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	T
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	T
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	T
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Σταθερότητα πρωτεϊνών

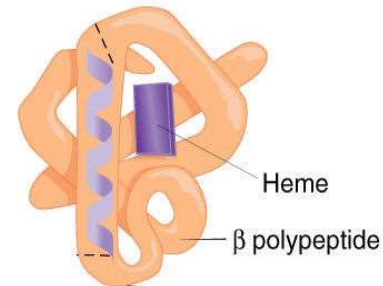
- Εν αντιθέσει με τα συνήθη φάρμακα στην έννοια της σταθερότητας εντάσσεται και η διατήρηση της στερεοχημικής τους διαμόρφωσης.
- Πρωτογενής δομή: η αλληλουχία αμινοξέων
- Δευτερογενής δομή: οι πρωτεΐνες δεν είναι μόνο πολυμερή αμινοξέων, αλλά δημιουργούν 3-διάστατες δομές από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ NH και CO των αμινοξέων.
- Τριτογενής δομή, η πολυπλοκότερη σε μία πρωτεΐνη-πολυμερές: οι R-ομάδες των αμινοξέων δημιουργούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, πχ μεταξύ -S.
- Τεταρτογενής δομή: οι πρωτεΐνες χρειάζονται περισσότερα από ένα πρωτεϊνικά-πολυμερή μόρια, π.χ. 2 ίδιες πρωτεΐνες-πολυμερή συνθέτουν μία ενεργή πρωτεΐνη.



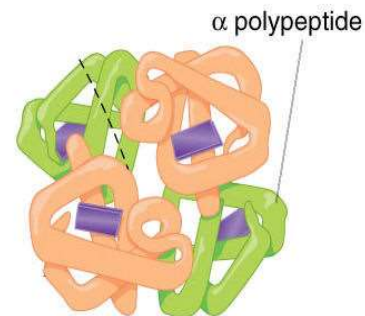
(a) Primary structure



(b) Secondary structure



(c) Tertiary structure



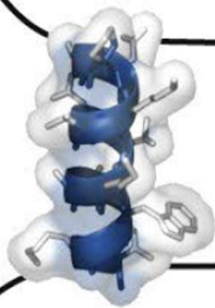
(d) Quaternary structure

Σταθερότητα πρωτεϊνών

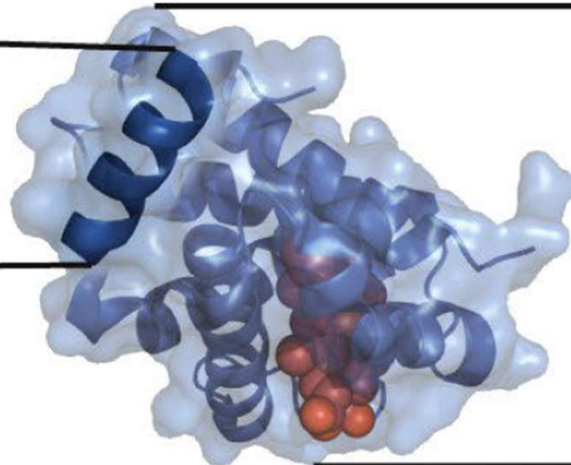
Primary structure

Pro
Ala
Asp
Lys
Thr
Asn
Val
Lys
Ala
Ala
Trp
Gly
Lys
Val

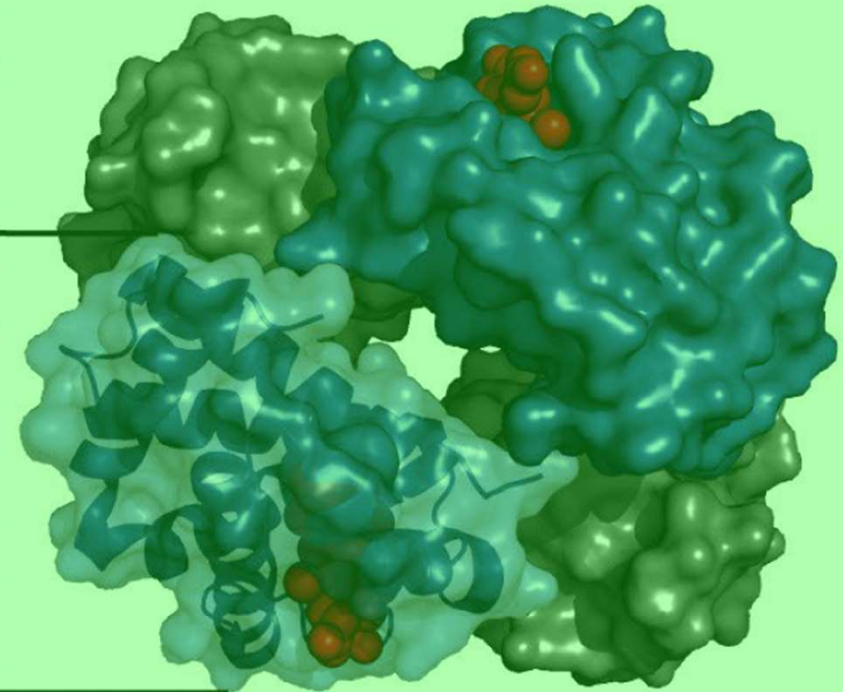
Secondary structure



Tertiary structure



Quaternary structure

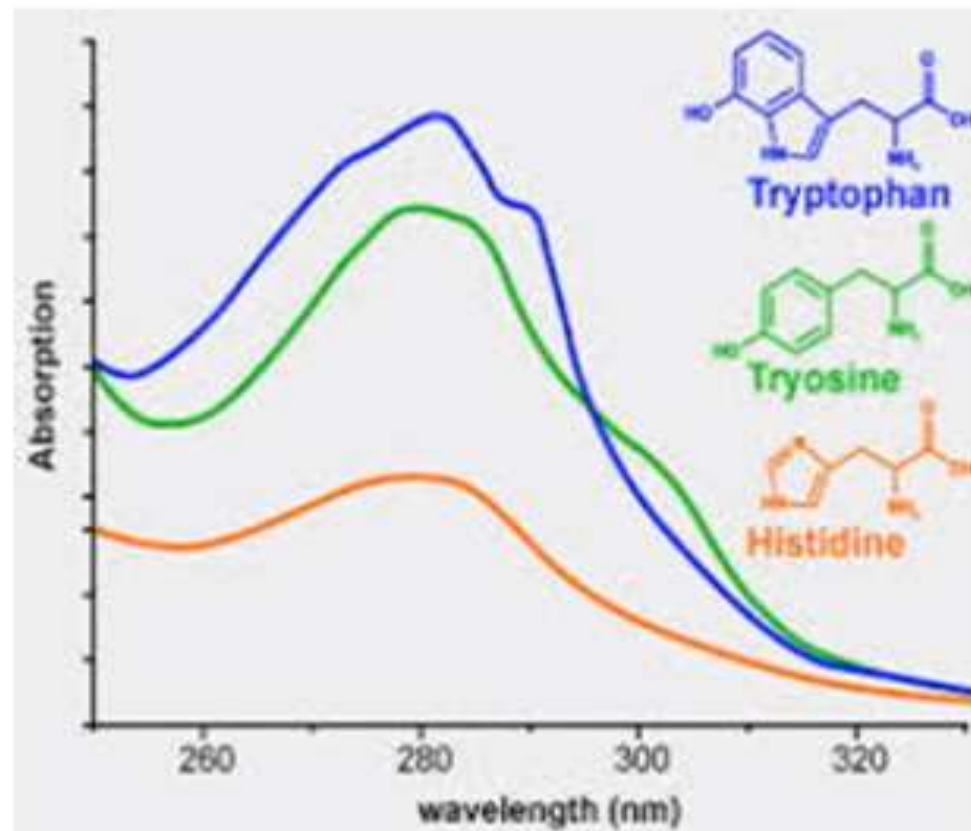


Amino acid residues

Φυσικά χαρακτηριστικά

- **ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΣΤΟ UV**

- Τα αμινοξέα Trp, Tyr, Phe και His έχουν αρωματικές ομάδες.
- Οι πρωτεΐνες έχουν ισχυρή απορρόφηση στα 280 nm.
- Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε διάλυμα μπορεί να υπολογιστεί εάν ο αριθμός των τρυπτοφανών Trp και τυροζινών Tyr είναι γνωστός.



Φυσικά χαρακτηριστικά

- **ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΟΛΛΟΕΙΔΟΥΣ**

- Διάλυμα (< 1 nm)
- Κολλοειδές (1-100 nm)
- Εναιώρημα (>100 nm)
- Πρωτεΐνη 2-20 nm

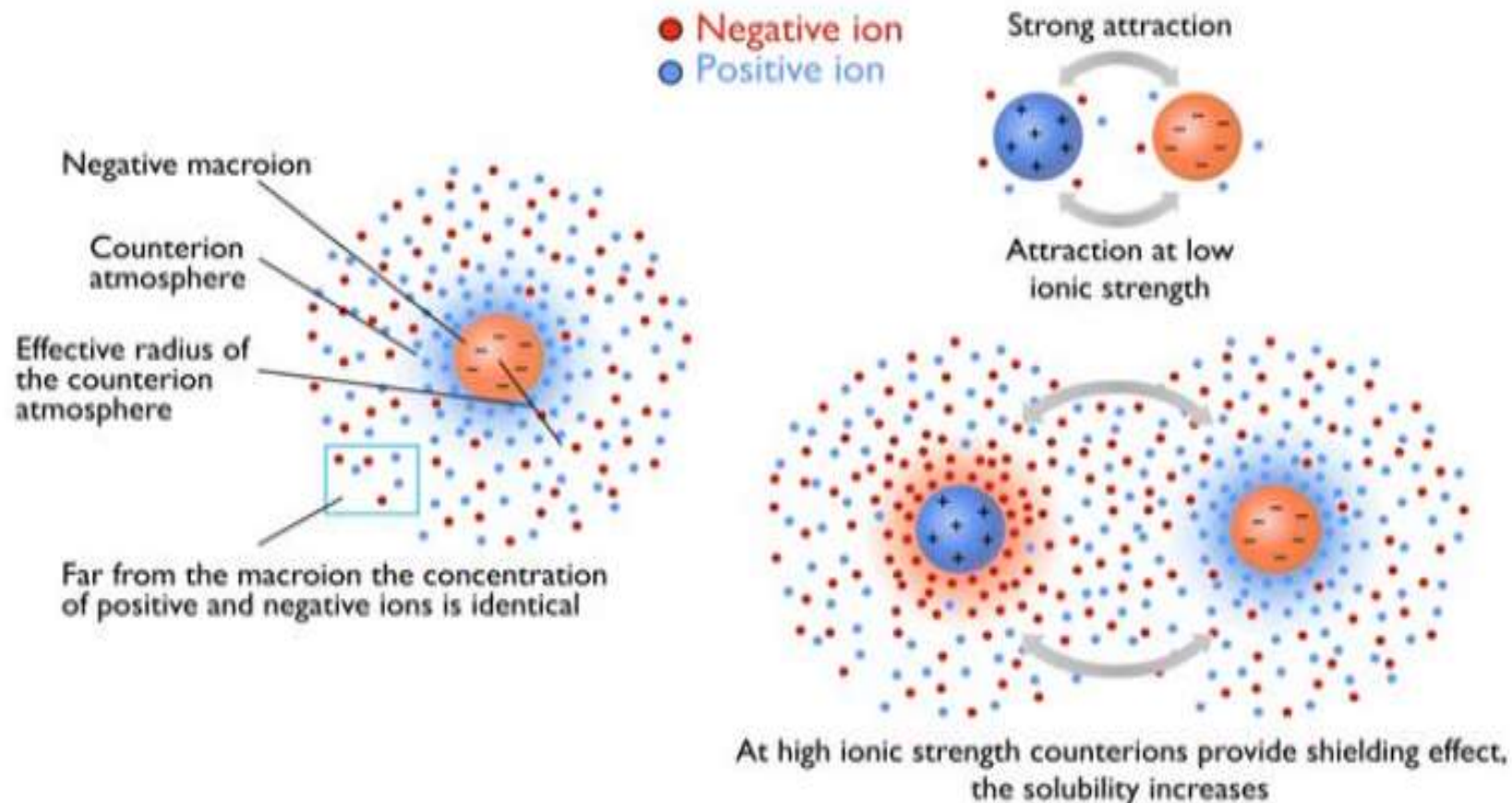
Το διάλυμα πρωτεΐνης έχει κολλοειδείς ιδιότητες (μεγάλο ιξώδες, υψηλή ικανότητα απορρόφησης, δεν διέρχεται από μια ημιπερατή μεμβράνη)

Φυσικά χαρακτηριστικά

- **ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ**
- Επηρεάζεται από την ισορροπία υδρόφοβων και υδρόφιλων αμινοξέων στην επιφάνειά της
- Τα φορτισμένα αμινοξέα παίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στη διατήρηση της πρωτεΐνης διαλυτής
- Η διαλυτότητα καθορίζεται από τις δυνάμεις απώθησης μεταξύ των μορίων πρωτεΐνης και από τη στιβάδα νερού ενυδάτωσης
- Οι πρωτεΐνες είναι λιγότερο διαλυτές στο ισοηλεκτρικό τους σημείο (χωρίς καθαρό φορτίο)
- Η πρωτεΐνη γίνεται όλο και περισσότερο διαλυτή καθώς το **pH** αυξάνεται ή μειώνεται μακριά από το **pI**

Φυσικά χαρακτηριστικά

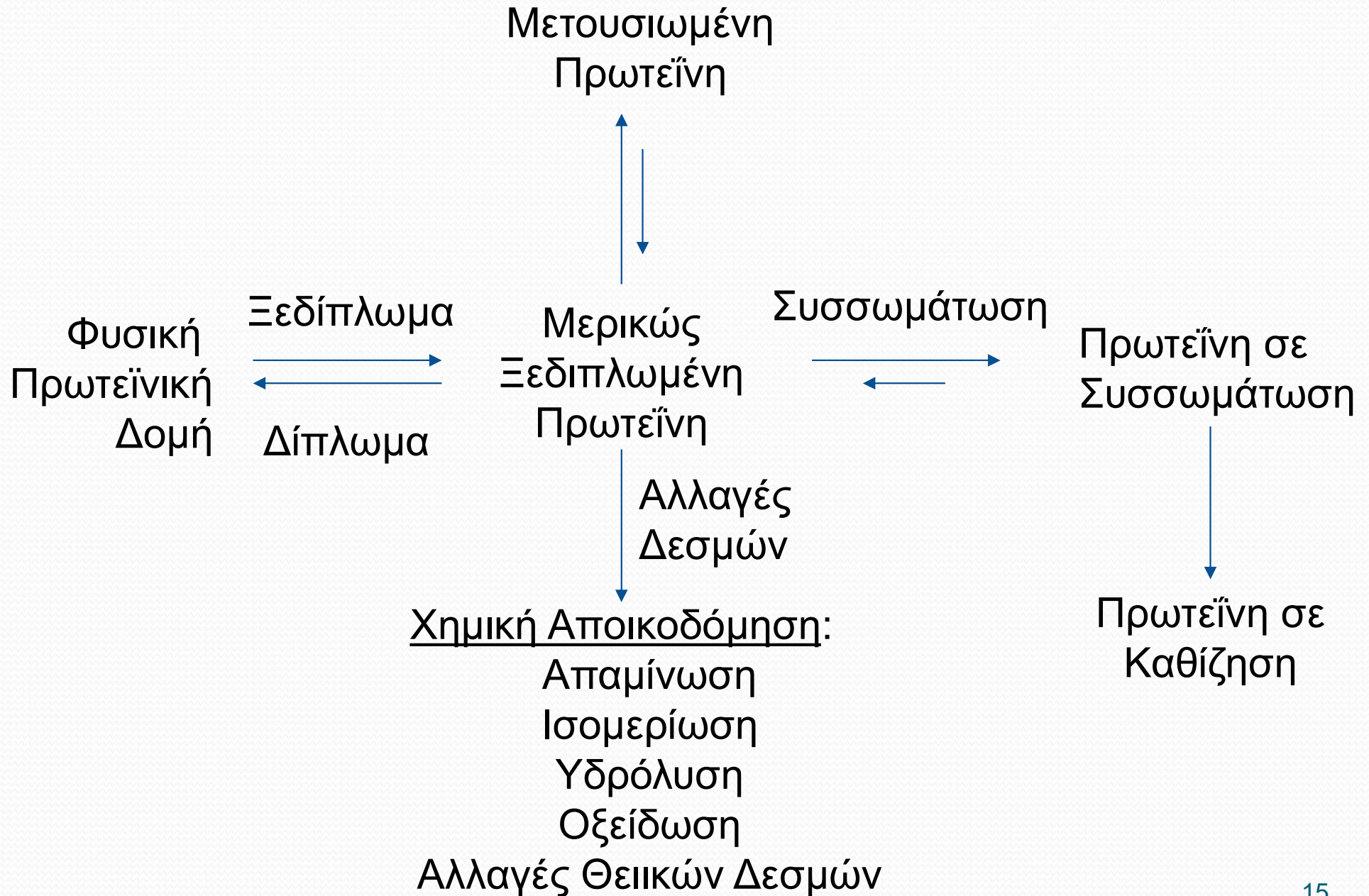
- **ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ**
- Τα θετικά και αρνητικά φορτισμένα μικρά ιόντα (**άλατα**) σε διάλυμα μπορούν να συγκεντρωθούν γύρω από τις φορτισμένες πλευρικές ομάδες
- Αυτά τα ιόντα μπορούν να "διαβάσουν" αλληλεπιδρούσες πλευρικές ομάδες μεταξύ τους



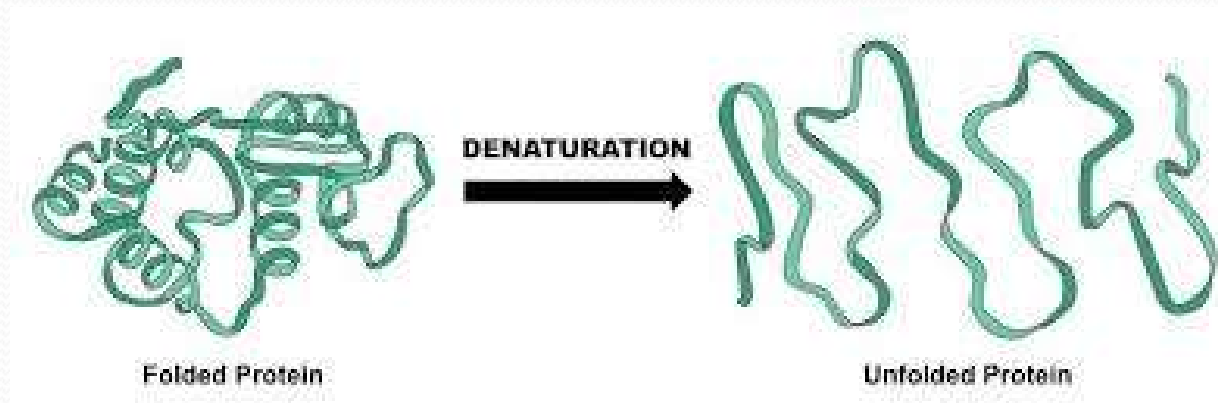
Φυσικά χαρακτηριστικά

- **ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ**
- Σε **χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος** αυξάνεται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης : οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πλευρικών ομάδων στο pI είναι τέτοιες που αποτρέπεται η συσσωμάτωση.
- Σε **υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων** μειώνεται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης: τα ιόντα άλατος δεσμεύονται σε μόρια νερού και διαταράσσουν το υδρολυτικό στρώμα των πρωτεϊνών.

Κλασσικές οδοί διάσπασης



Μετουσίωση πρωτεΐνης-πεπτιδίου



Η μετουσίωση προκαλεί αύξηση του ιξώδους
Παρά τη διατήρηση της χημικής ακεραιότητας (απείραχτοι οι πεπτιδικοί δεσμοί), η πρωτεΐνη χάνει τη λειτουργικότητά της (π.χ. Ενζυμική ενεργότητα).

Η πρωτεΐνη μπορεί να επανέλθει στην αρχική της μορφή απουσία του αιτίου που την προκάλεσε

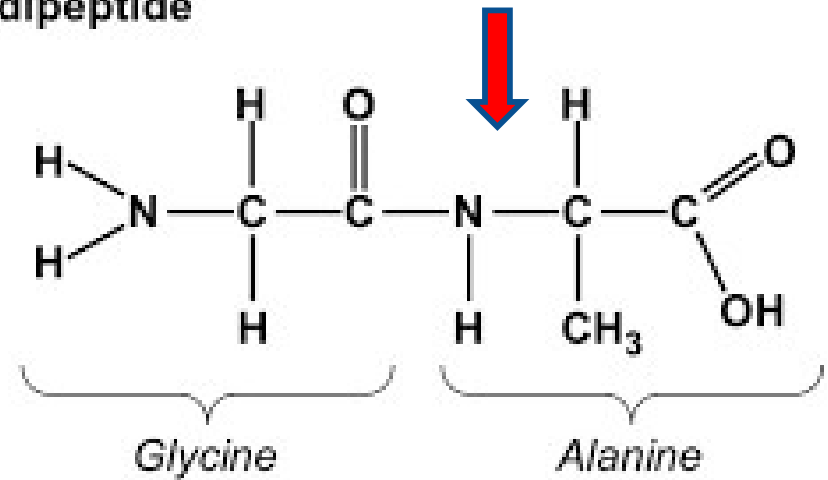
Μετουσίωση πρωτεΐνης-πεπτιδίου

- Η φυσική δομή (native state) των πρωτεϊνών (πρωτο-τεταρτογενής) είναι ουσιαστικές για τη ζωή: κατάλυση, διατήρηση δομών, μεταφορά σημάτων.
- Η μετουσίωση/συσσωμάτωση των πρωτεϊνών είναι μία μη-φυσιολογική κατάσταση και μπορεί να συμβεί σε συγκεκριμένες συνθήκες.
- Η τάση των πρωτεϊνών να συ-συμμάζονται αυξάνεται μετά τη μετουσίωση.

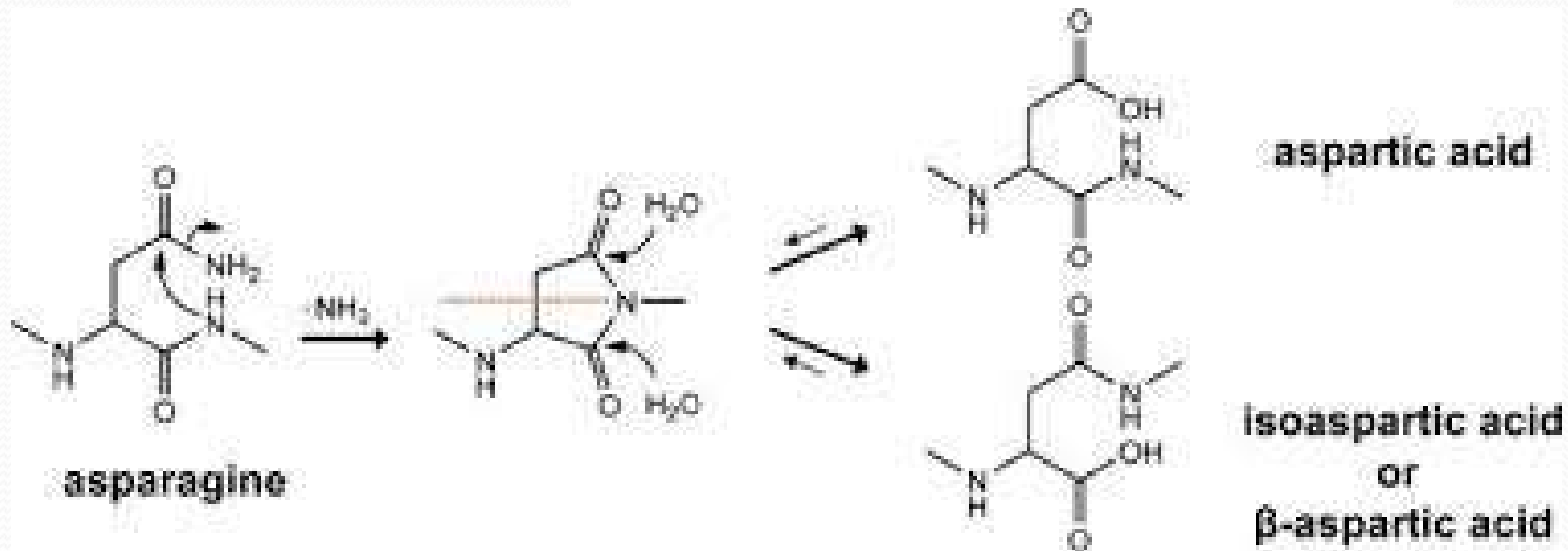
Κλασσικές οδοί διάσπασης

Υδρόλυση από οξέα ή βάσεις (πεπτιδικός δεσμός)

A dipeptide



Απαμίνωση



(Φωτο)οξειδωση

Cysteine: entry into irreversible protein damage ?

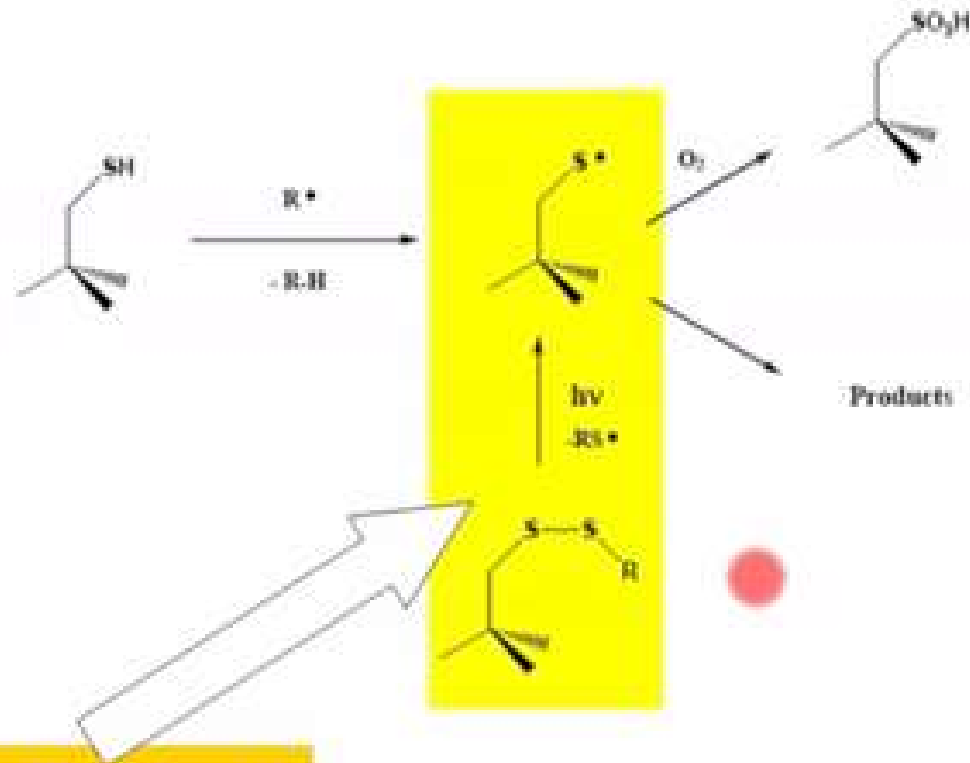
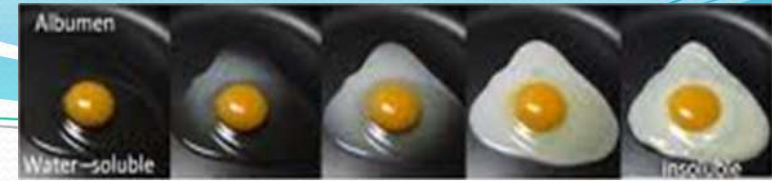


Photo-initiated disulfide bond cleavage and free radical formation

* Δισουλφικοί δεσμοί (μεταξύ 2 ατόμων θείου) είναι σημαντικοί για την τριτογενή πρωτεϊνική δομή και την σταθερότητα. Αλλαγές στους δισουλφικούς δεσμούς προκαλούν αλλαγές στην δευτερογενή και τριτογενή δομή και αλλοίωση της βιολογικής δράσης

* Ελεύθερη ρίζα είναι ένα άτομο, μόριο ή ιόν που έχει ένα τουλάχιστον ασύζευκτο ηλεκτρόνιο δεσμού. Ασύζευκτα ηλεκτρόνια κάνουν τις ρίζες πολύ ενεργές σε αντιδράσεις.

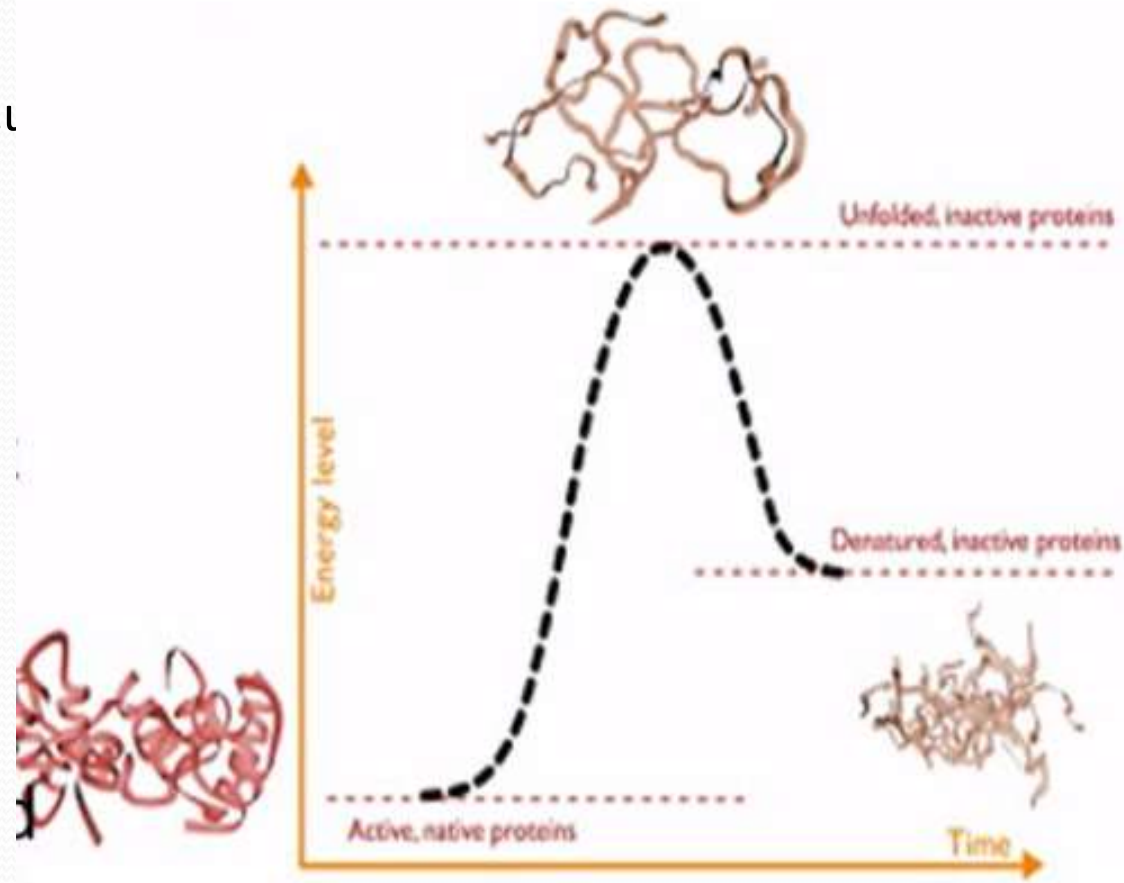
Παράγοντες που προκαλούν μετουσίωση



- **Θερμοκρασία:** Η υψηλή θερμοκρασία αποσταθεροποιεί τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις που συγκρατούν την πρωτεΐνη. Οι δεσμοί υδρογόνου επηρεάζονται περισσότερο. Η κατάψυξη μπορεί επίσης να προκαλέσει μετουσίωση λόγω κρυστάλλων πάγου και εξασθένησης των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Σε μια αργά αυξανόμενη θερμοκρασία, η διαμόρφωση της πρωτεΐνης παραμένει ανέπαφη σε ένα σχετικά ευρύ εύρος θερμοκρασιών.

Η απότομη απώλεια της δομής (και της λειτουργίας) συμβαίνει σε ένα στενό εύρος θερμοκρασιών



Παράγοντες που προκαλούν μετουσίωση

- **Συγκέντρωση:** Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών επηρεάζει την σταθερότητά τους, αλλά όχι με τον ίδιο τρόπο; κατά περίπτωση.
- Η συσσωμάτωση των πρωτεϊνών μπορεί να αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσής τους.

ή

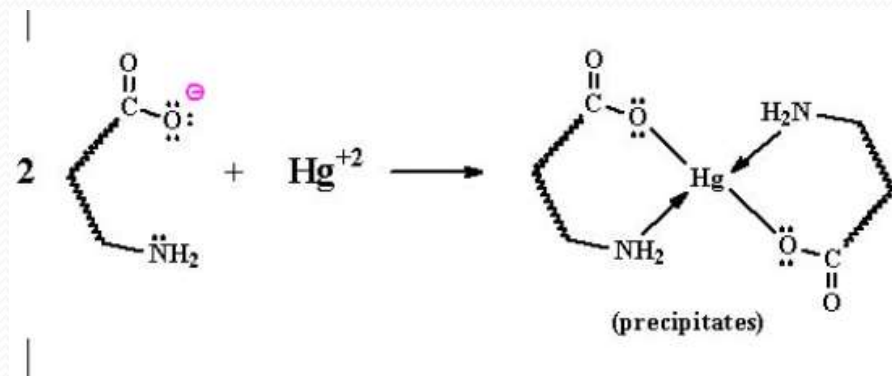
- Η συσσωμάτωση των πρωτεϊνών μπορεί να μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσής τους, πχ όταν δημιουργούνται διμερή ανθεκτικά στη συσσωμάτωση.
- Η αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών βελτιώνει την σταθερότητά τους σε συνθήκες κατάψυξης.

Παράγοντες που προκαλούν μετουσίωση

- **Υδροστατική πίεση:** Αποσταθεροποίηση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Τα μόρια νερού μπορούν να διεισδύσουν στον υδρόφοβο πυρήνα πρωτεΐνης.
- **Η υπεριώδης ακτινοβολία:** παρόμοια με την επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας: η υψηλότερη κινητική ενέργεια αυξάνει τη δόνηση των μορίων προκαλώντας έτσι διαταραχές των δεσμών H.
- **Ακτίνες Χ.**
- **Βίαιη ανακίνηση (διαταραχή του δεσμού H).**

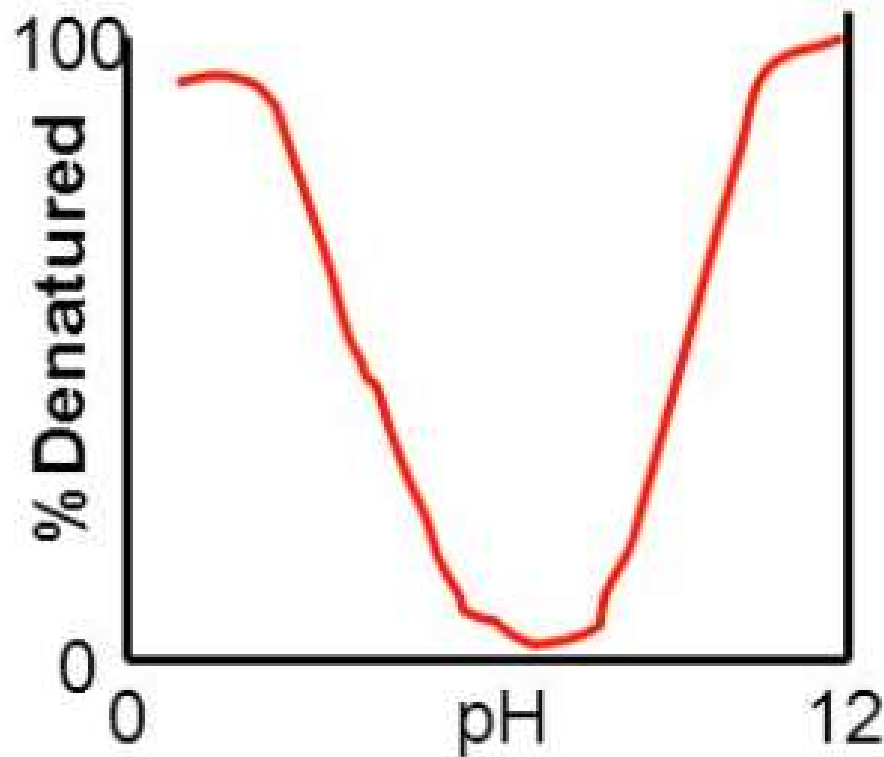
Παράγοντες που προκαλούν μετουσίωση (Χημικοί)

- **Οξέα και αλκάλια.** Αλλάζουν το pH
- **Οργανικοί διαλύτες** (αιθέρας, αλκοόλη): Οι οργανικοί διαλύτες μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες δια διακόπτοντας την ενδομοριακή σύνδεση υδρογόνου πλευρικής αλυσού.
- Στη συνέχεια σχηματίζονται νέοι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του νέου μορίου οργανικού διαλύτη και των πλευρικών αλυσίδων πρωτεΐνης.
- **Άλατα βαρέων μετάλλων** (Pb^{2+} , Hg^{2+}): Συνήθως αδιάλυτο άλας μετάλλου-πρωτεΐνης



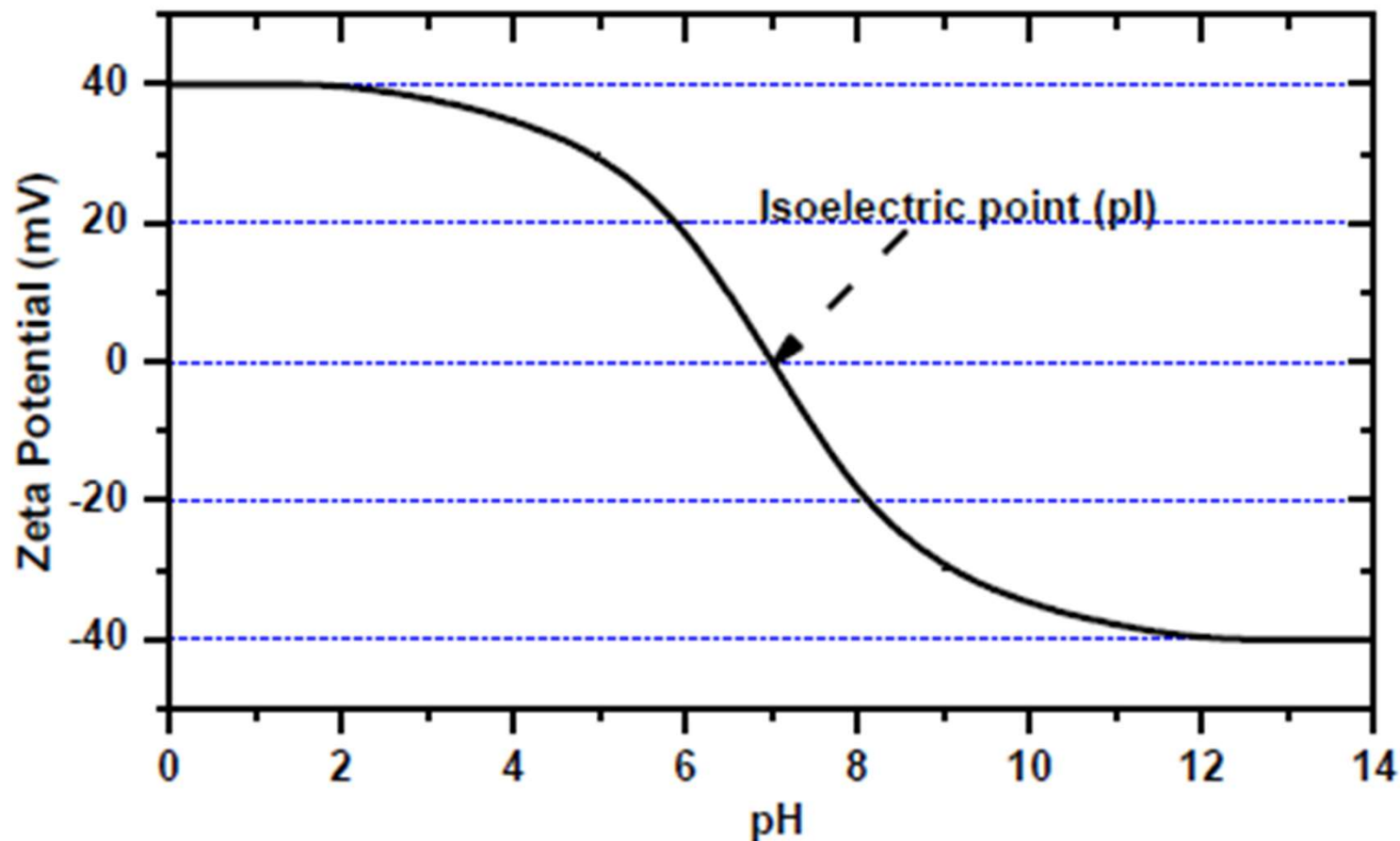
Παράγοντες που προκαλούν μετουσίωση (Χημικοί)

- Οι πρωτεΐνες είναι πιο σταθερές έναντι της μετουσίωσης στο ισοηλεκτρικό σημείο τους, σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο pH.
- Στις ακραίες τιμές του pH, η ισχυρή ενδομοριακή ηλεκτροστατική απώθηση που προκαλείται από το υψηλό καθαρό φορτίο έχει ως αποτέλεσμα τη διόγκωση και το ξεδίπλωμα του μορίου πρωτεΐνης.



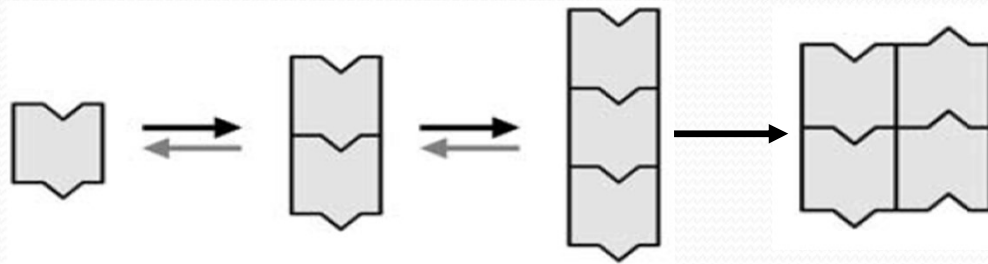
Παράγοντες που προκαλούν μετουσίωση (Χημικοί)

- Το pH επηρεάζει τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών μέσω αλλαγών στα επιφανειακά φορτία (την υδρόφιλη περιοχή).
- Η σχέση μεταξύ πρωτεϊνικού φορτίου και pH.
- Στο ισοηλεκτρικό σημείο pI η πρωτεΐνη μπορεί να υποστεί συσσωμάτωση.
- Οι πρωτεΐνες είναι σταθερές σε μία μικρή περιοχή pH: ρυθμιστικά.

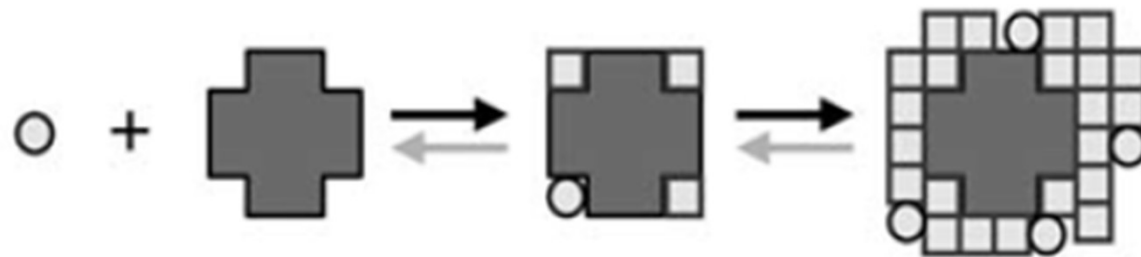


Μηχανισμοί μετουσίωσης/συσσωμάτωσης

- Μία πρωτεΐνη μετουσιώνεται / συσσωματώνεται με περισσότερους από ένα μηχανισμούς.
- Η μετουσίωση/συσσωμάτωση των πρωτεϊνών ξεκινάει από υδρόφοβες ομάδες.
- Το υδρόφοβο δυναμικό είναι σημαντικός παράγοντας σταθερότητας 3-διάστατης δομής πρωτεΐνης.
- Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις από ιόντα αλάτων είναι πολύ ειδικές σε σχέση με την πρωτεϊνική δομή και δρουν είτε σταθεροποιητικά είτε αποσταθεροποιητικά.
- Οι μηχανισμοί:
- I: Μονομερές με μονομερές με συμπληρωματικές δομές μονομερούς.

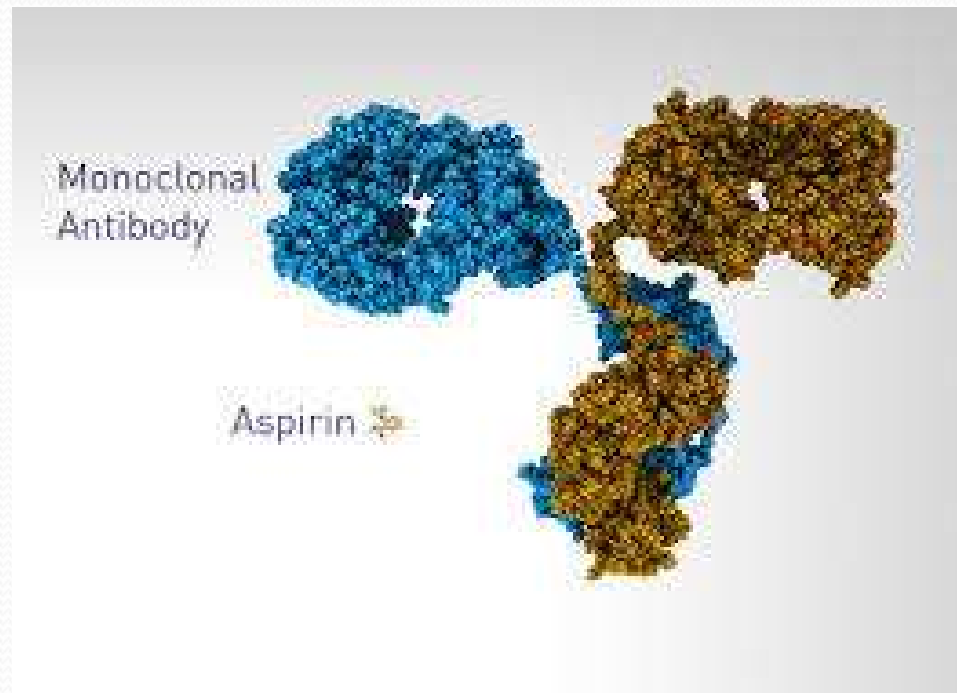


- II: Αλλαγές στην 3-διάστατη δομή μπορεί να προκαλέσει μετουσίωση/συσσωμάτωση. Οι αλλαγές προκαλούνται από δονήσεις, αναμίξεις, θερμάνσεις κατά την παραγωγή.
- III: Συσσωμάτωση με βάση εξωτερικό πυρήνα.



Οι πρωτεΐνες ως φάρμακα (βιολογικά φάρμακα)

- Η χρήση πρωτεϊνών ως φαρμάκων δεν είναι καθόλου νέα. Η ινσουλίνη, η γ-σφαιρίνη και τα εμβόλια που περιέχουν πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες. Ωστόσο, η έλευση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA έχει οδηγήσει σε δραματική επέκταση του ενδιαφέροντος για τις φαρμακευτικές τους εφαρμογές.
- Μεγάλη χρήση στην ογκολογία (αντισώματα) και σε αυτοάνοσα νοσήματα ή σε κληρονομικές παθήσεις

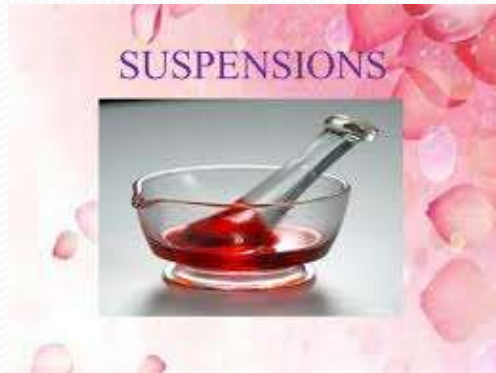


Βιολογικά vs Χημικά φάρμακα

- 😊 Μειωμένη **τοξικότητα** παραγόμενων προϊόντων
- 😊 Περισσότερο προβλέψιμη **in vivo συμπεριφορά** προϊόντων
- 😊 Ταχεία **διαθεσιμότητα στην αγορά**
- 😞 **Επιμόλυνση** από βιολογικές **προσμίξεις**
- 😞 Αλλαγή **στεreoχημικής διάταξης**
- 😞 **Πολυπλοκότητα**
- 😊 **Σταθερές ενώσεις**
- 😊 **Μη ανοσογόνα**
- 😊 Χορηγούνται δια **στοματικής οδού**
- 😞 **Επιβαρυμένο περιβαλλοντικό αποτύπωμα**
- 😞 **Μείωση δραστικής ουσίας (API)**
- 😞 **Περίπλοκες συνθετικές οδοί**
- 😞 **Τοξικότητα**

Φαρμακοτεχνική μορφή

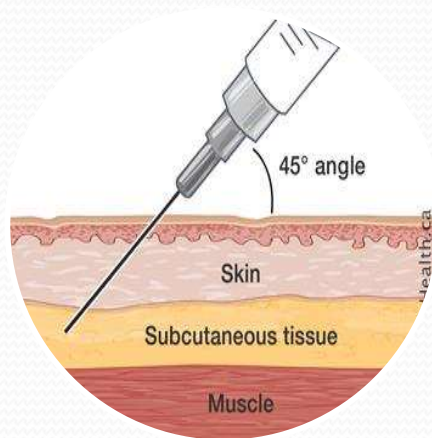
- Τα περισσότερα φάρμακα βασισμένα σε πρωτεΐνες **διαμορφώνονται** ως:
 - Εναιωρήματα (Suspensions) ή υδατικά διαλύματα (aqueous solutions)



- Και **εμπορεύονται** ως:
 - Έτοιμη μορφή (ready-to-use) ή ως προϊόν λυοφιλοποίησης για ανασύσταση.

Χορήγηση φαρμακομορίων

- Χορήγηση δια του στόματος **ΑΛΛΑ** για τις πρωτεΐνες, όχι εφικτή (χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα)
- Προσπάθειες βελτίωσης βιοδιαθεσιμότητας μέσω εναλλακτικών οδών (ρινικής και αναπνευστικής οδού)



Αστάθεια στο
γαστρεντερικό
σύστημα

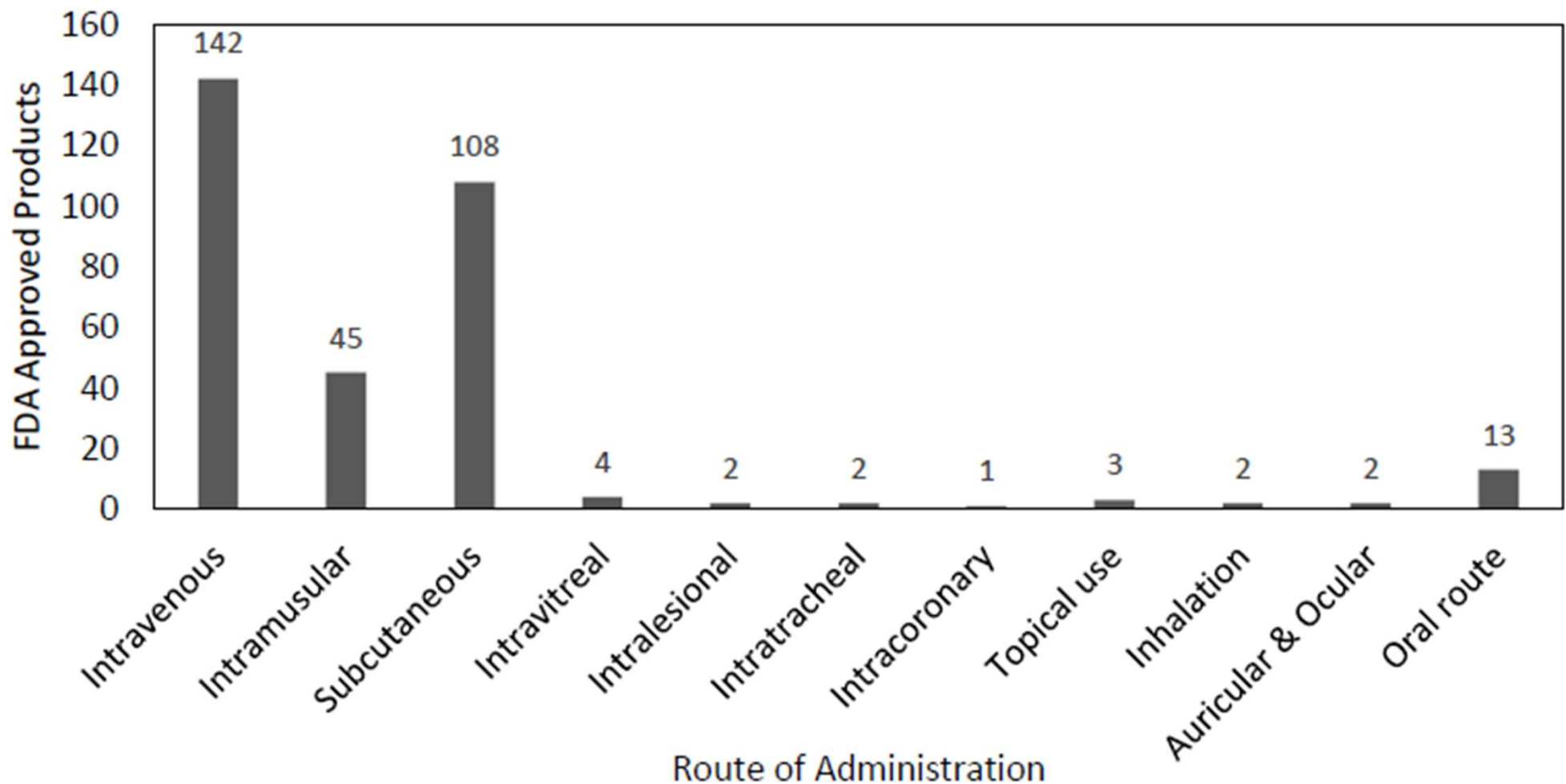
Χαμηλή
διαπερατότητα
σε βιολογικές
μεμβράνες

➤ μεγάλο μοριακό
βάρος

➤ πολική επιφάνεια

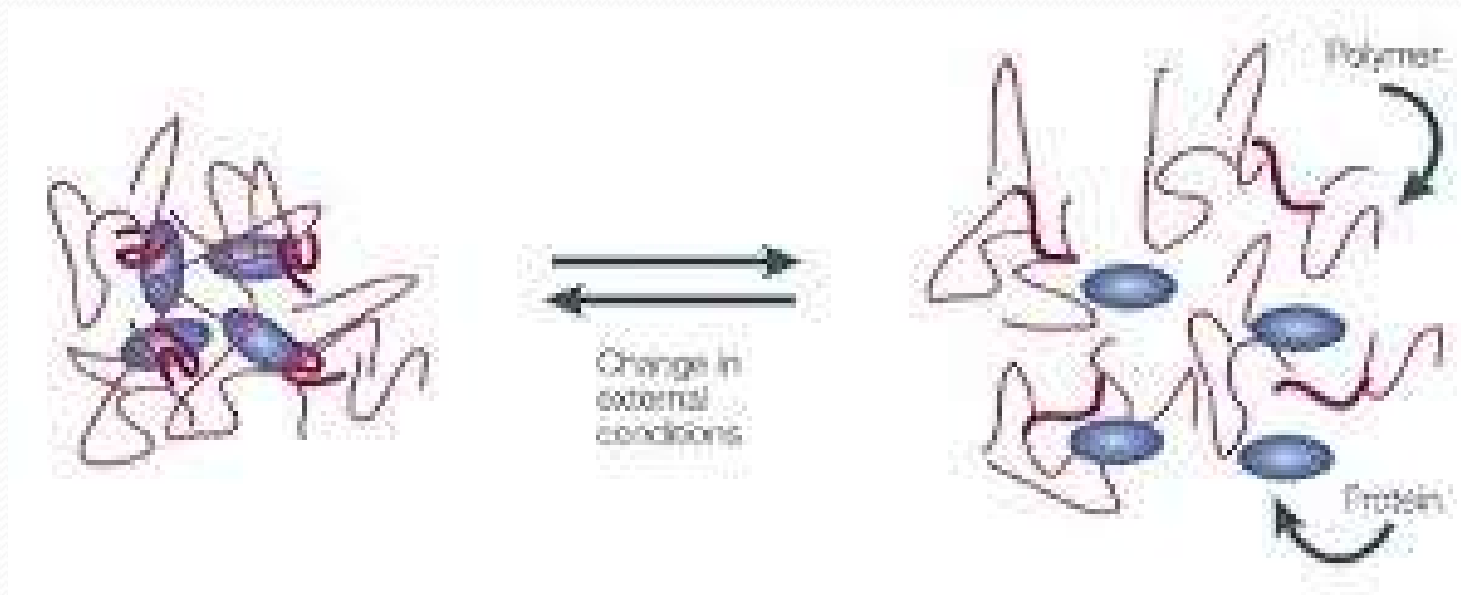
Χορήγηση φαρμακομορίων

- Τα πρωτεϊνικά φάρμακα είναι υγρής ή στερεάς μορφής με δόσεις, ανάλογα με τη σταθερότητα και τα θεραπευτικά αποτελέσματα.
- FDA 2015: κυρίως ενδοφλέβια, ενδομυϊκά και υποδόρια



Παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα πρωτεϊνικών φαρμάκων:

- Η διαδικασία παρασκευής του φαρμακοτεχνικού σκευάσματος
- Η φαρμακοτεχνική μορφή
- Η αποθήκευση
- Το pH
- Η συγκέντρωση αλάτων
- Η παρουσία προσμίξεων
- Τα υλικά συσκευασίας (προσρόφηση, μετανάστευση)



Σταθεροποίηση πεπτιδίων και πρωτεϊνών σε φαρμακευτικά σκευάσματα – Ο ρόλος των εκδόχων

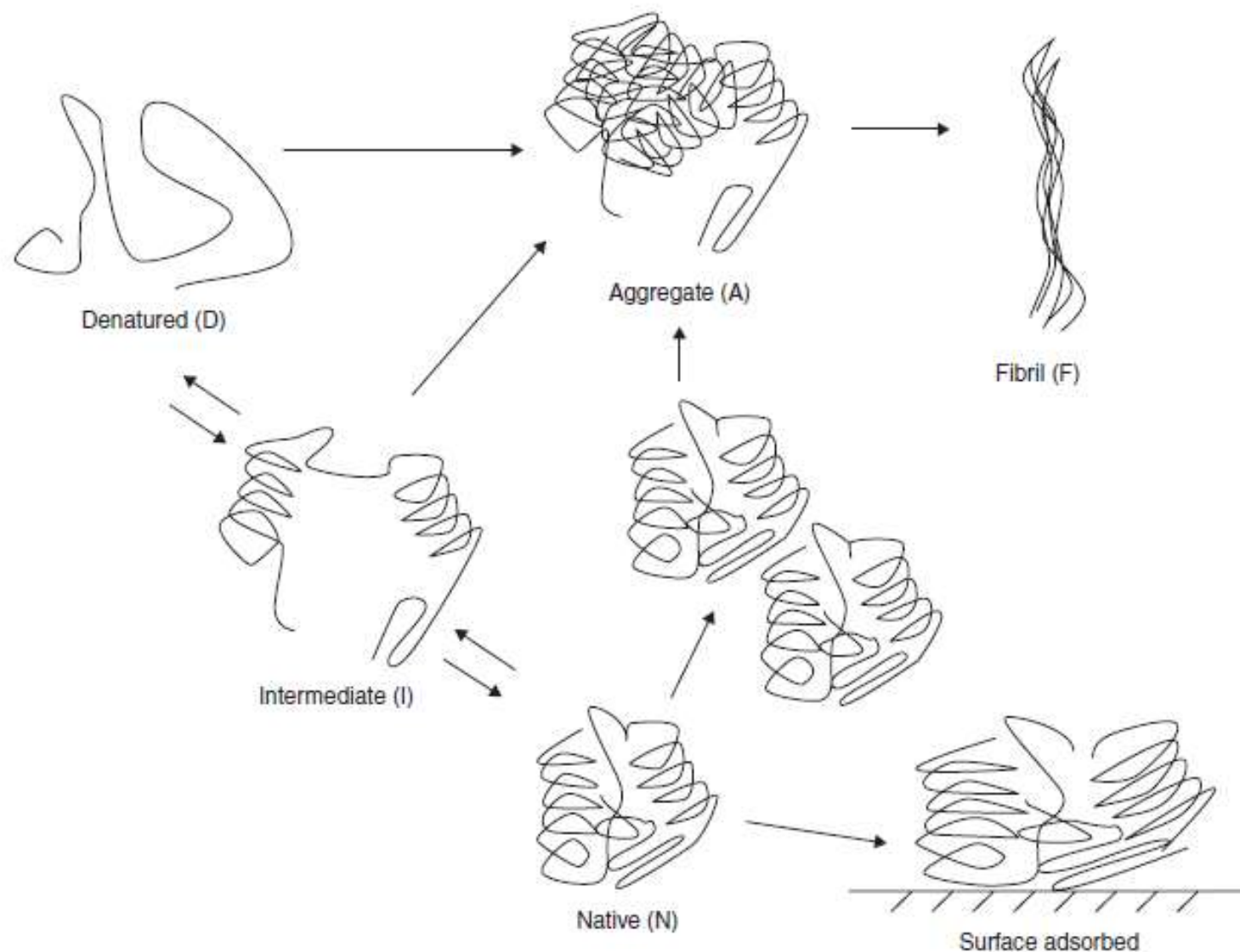


Figure 1. The protein aggregation process. It is an equilibrium between the folded native (N) and the disordered, unfolded or denatured (D). An intermediate step, the formation of possible intermediates (I), can be present between the transformation from N to D. The aggregate (A) formed may occur from irreversible changes to the unfolded species, protein–protein interaction, and can result in formations of fibrils (F). Surface adsorption of proteins could also lead to denaturation, aggregation, or fibrillation.

Υδατοδιαλυτά έκδοχα (αμινοξέα, πολυόλες, άλατα, σάκχαρα, επιφανειοδραστικοί παράγοντες, κυκλοδεξτρίνες κτλ)

Table 2. Recent examples of stabilising excipients used in peptide and protein formulations and their mechanism of stabilisation.

Stabilising excipient	Protein	Mechanism of stabilisation	Ref.
Amino acids	BSA, lysozyme, α -chymotrypsinogen, human antibody, cellular retinoic acid-binding protein	Preferential hydration Preferential exclusion Decrease protein-protein interactions Increase solubility (reduce viscosity*)	[13] [14,108]
Polymers	BSA, yeast hexokinase, recombinant human insulin	Competitive adsorption Steric exclusion Preferential exclusion Preferential hydration	[38] [59] [105]
Polyols	β -lactoglobulin, Invertase (EC 3.2.1.26)	Preferential exclusion Accumulation in hydrophobic regions	[111] [115]
Salts	Apoflavodoxin, amyloidogenic light chain protein	Preferential binding Interaction with protein bound water	[80,82]
Sugars	Ribonuclease-A, BSA	Preferential hydration Preferential exclusion Reduction of mobility resulting from increased viscosity	[15-17,43]
Surfactants	hGH, Albutropin, recombinant haemoglobin	Competitive adsorption	[34,57,116]

*Desirable in highly concentrated formulations.

BSA: Bovine serum albumin; hGh: Recombinant human growth hormone.

- Ο έλεγχος μετουσίωσης/συσωμάτωσης μπορεί να επιτευχθεί είτε με αλλαγή της πρωτεϊνικής δομής είτε με έκδοχα της φαρμακευτικού σκευάσματος.
- Πλήθος εκδόχων σε χρήση: σάκχαρα και πολυμερή τους, αμινοξέα, αμίνες, άλατα, πολυμερή και επιφανειοδραστικά.
- Πολύ σημαντική η διατήρηση του νερού που περιβάλλει τις πρωτεΐνες μέσω εκδόχων

- Έκδοχα για βελτίωση φυσικής και χημικής σταθερότητας πρωτεϊνών Π.χ. Καθυστέρηση της φυσικής αποσταθεροποίησης
- Εκδοχα για την αποφυγή αλλαγών του pH κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης
- Εκδοχα για την αποφυγή στερεοχημικών αλλαγών λόγω προσρόφησης
- Εκδοχα για τη βελτιστοποίηση της ποιότητας των προϊόντων

Λυοφιλοποίηση (ξηράνση υπό ψύξη)

- Φύλαξη των πρωτεϊνών σε διάλυμα σε χαμηλές θερμοκρασίες → Επέκταση της διάρκειας ζωής τους.
- Οι πρωτεΐνες μπορεί να μετουσιωθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες στην υγρή φάση, αλλά, γενικά, η κρύα μετουσίωση είναι αντιστρεπτή σε αντίθεση με την μετουσίωση σε υψηλές θερμοκρασίες
- Περιορισμός κινητικότητας πρωτεϊνών → Ξήρανση με κατάψυξη (freeze-drying)
- διαχωρισμός του υγρού νερού από ένα διάλυμα καταψυγμένο σε πάγο με εξαάνωση υπό κενό.

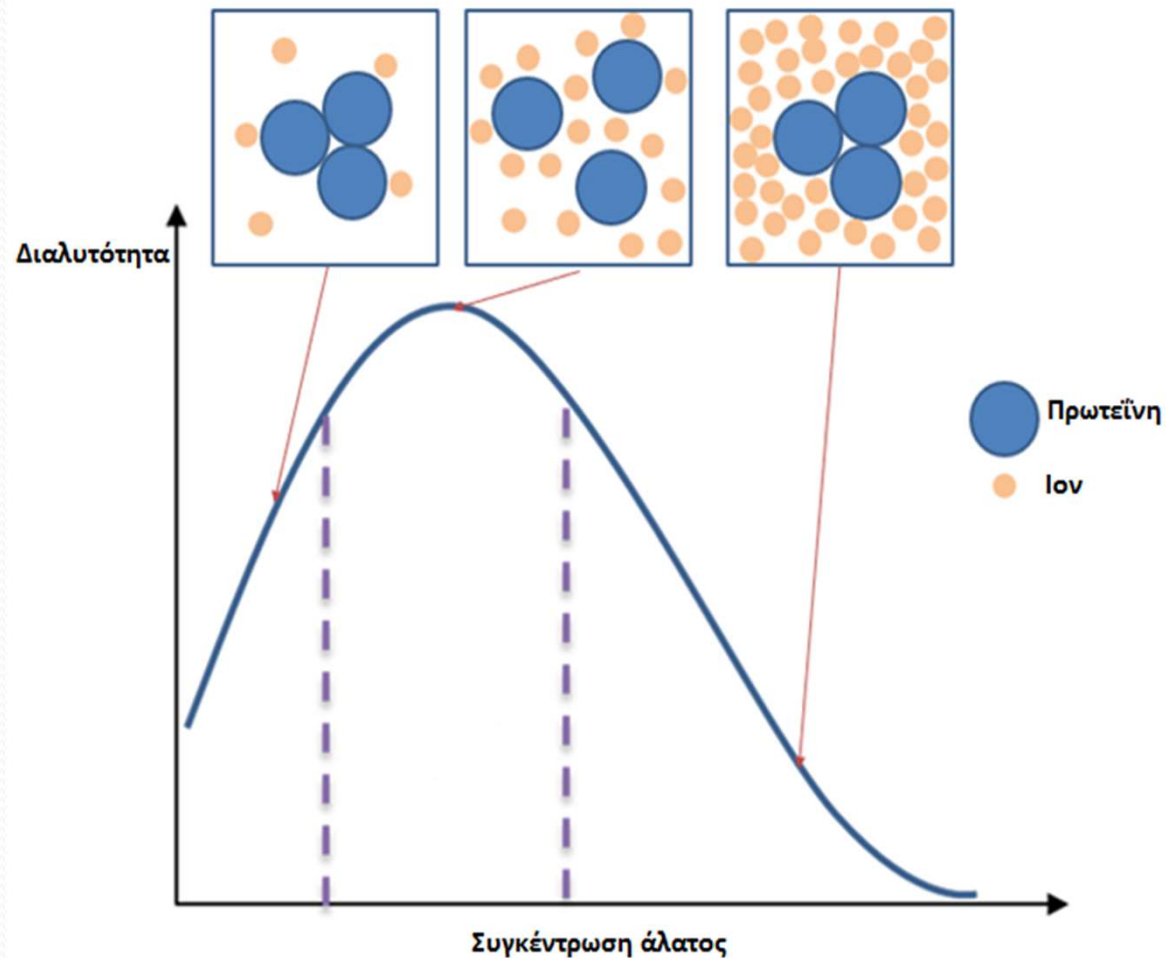


Λυοφιλοποίηση (ξήρανση υπό ψύξη)

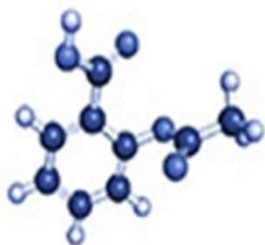
- Αν και η ξήρανση με κατάψυξη βελτιώνει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης κατά την αποθήκευση, η ίδια η διαδικασία δημιουργεί πολλές πιέσεις ειδικά από την κατάψυξη και την αφυδάτωση που μπορεί να αποσταθεροποιήσουν τη φυσική δομή του μορίου της πρωτεΐνης.
- Η θεμελιώδης κατανόηση αυτής της διαδικασίας μονάδας είναι ο διαχωρισμός του υγρού νερού από ένα διάλυμα σε χαμηλές θερμοκρασίες με τη μορφή στερεού πάγου και η επακόλουθη αφαίρεσή του με εξάχνωση υπό κενό, αφήνοντας τις διαλυμένες ουσίες στην άμορφη ή σχεδόν άμορφη κατάστασή τους.
- Η διαδικασία λυοφιλοποίησης αποτελείται κυρίως από τρία στάδια κατάψυξης, πρωτογενούς ξήρανσης και δευτερογενούς ξήρανσης.
- Το στάδιο κατάψυξης είναι το **πρώτο στάδιο** και συνεπάγεται την κατάψυξη ενός υγρού (υδατικού) σκευάσματος για την παραγωγή μιας στερεής μήτρας κατάλληλης για ξήρανση. Μέσα από αυτό το στάδιο, ο διαλύτης διαχωρίζεται από τη διαλυμένη ουσία με τη μορφή κρυστάλλων πάγου. Ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου παγιδεύει τις διαλυμένες ουσίες στην ενδιάμεση περιοχή μεταξύ των κρυστάλλων πάγου. Η θερμοκρασία που απαιτείται για την επίτευξη μιας βέλτιστης (αν όχι ολικής) κατάψυξης του σκευάσματος εξαρτάται από τον διαλύτη και τα έκδοχα.
- **Πρωτογενής ξήρανση**: Το στάδιο είναι η μείωση (ή η αφαίρεση) του πάγου από την ενδιάμεση περιοχή μέσω εξάχνωσης σε χαμηλή πίεση του θαλάμου λυοφιλίωσης, διατηρώντας παράλληλα τη θερμοκρασία του προϊόντος σε χαμηλό επίπεδο στόχο.
- Το υπολειμματικό νερό (υγρασία) είναι ο κύριος λόγος για τον οποίο η **δευτερογενής ξήρανση** περιλαμβάνεται ως το τρίτο στάδιο στην λυοφιλίωση. Ο θεμελιώδης σκοπός αυτού του σταδίου είναι η περαιτέρω μείωση του δεσμευμένου νερού έως ότου η υπολειπόμενη περιεκτικότητα σε υγρασία φτάσει στο επιδιωκόμενο επίπεδο. Πράγματι, εξαιτίας αυτού του σταδίου ένα προϊόν που θα είχε αποθηκευτεί αποτελεσματικά στους ≈ 4 °C, όπως ένα εμβόλιο για μερικές εβδομάδες, μπορεί τώρα να αποθηκευτεί σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος για μήνες.

Εξαλάτωση πρωτεϊνών (Salting out effect)

- Μια από τις πιο γνωστές μεθόδους σταθεροποίησης πρωτεϊνικών μορίων
- Προσθήκη σακχάρων ή αλάτων σε πρωτεϊνικό διάλυμα.
- Ανάπτυξη υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών
- Αποτροπή σχηματισμού διαμόρφωσης που να ευνοεί σχηματισμό συσσωματωμάτων.



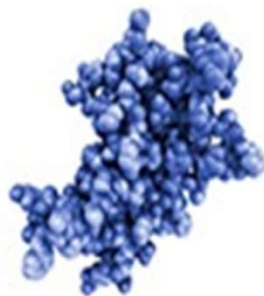
**Small molecule
drugs (Chemical)**



Aspirin
21 atoms



Small biologic



Somatotropin
3.091 atoms



Large biologic



IGG Antibody
~ 25.000 atoms



complexity

Αναφορές

1. Παρουσίαση κ. Ι. Ντότσικας
2. JOSEPH DARKWAH, Protein stability: Impact of formulation excipients and manufacturing processes in protein-based pharmaceuticals, PhD Thesis, LEICESTER SCHOOL OF PHARMACY, DE MONTFORT UNIVERSITY, 2017
3. John L. Tymoczko, Jeremy M. Berg, Lubert Stryer, Biochemistry, A Short Course, 2015, W. H. Freeman and Company